



Espacenet

Bibliographic data: JP 55156592 (A)

PREPARATION OF ANTIBIOTIC SUBSTANCE* GENTAMICIN C1A

Publication date: 1980-12-05
Inventor(s): FUJII TADAYO; SATOI SHIYUZOU; MUTOO NAOKI; KODAMA AKIRA; KOTANI MASARU
Applicant(s): TOYO JOZO KK
Classification:
- international: A61K35/74; C12P1/06; C12R1/01; (IPC1-7): C12P1/06; C12R1/01
- European:
Application number: JP19790060021 19790515
Priority number(s): JP19790060021 19790515
Also published as: • JP 61022955 (B)
• JP 1355899 (G)

Abstract of JP 55156592 (A)

PURPOSE: To prepare an antibiotic substance, gentamicin C1a, by culturing gentamicin C1a-producing fungi belonging to *Dactylosporangium* genus. CONSTITUTION: Fungi capable of producing an antibiotic substance, gentamicin C1a, and belonging to *Dactylosporangium* genus, e.g. *Dactylosporangium thailandense* G367, etc. are cultured in a conventional culturing medium at 25-35 deg.C for 100-200hr under aeration, and after adjusting the pH of the cultured medium to acidic range, the medium is neutralized and filtered to obtain the filtrate of the cultivation products. The filtrate is treated with an anion exchange resin, the adsorbed active substance is eluted with 2N aq. ammonia, and the eluate is concentrated, adjusted on pH, and treated with an anion exchange resin; The adsorbed material is eluted with aq. ammonia having concentration gradient extending over 0 and 0.35N, and the active fraction is concentrated under reduced pressure, and freeze-dried to obtain the objective antibiotic substance, gentamicin C1a.

Last updated: 04/04/2011 Worldwide Database 5.7.20, 62p

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭55-156592

⑬ Int. Cl.³
C 12 P 1/06
// C 12 R 1/01

識別記号
厅内整理番号
6760-4B

⑭ 公開 昭和55年(1980)12月5日
発明の数 1
審査請求 未請求

(全 7 頁)

⑮ 抗生物質ゲンタミシンClaの製造法

⑯ 特願 昭54-60021
⑯ 出願 昭54(1979)5月15日
⑯ 発明者 藤井忠代
三島市光ヶ丘15の4
⑯ 発明者 里井秀三
静岡県田方郡函南町柏谷1277の
28
⑯ 発明者 武藤直紀

静岡県田方郡大仁町三福685
⑯ 発明者 児玉章
静岡県田方郡函南町平井1900の
3
⑯ 発明者 小谷勝
静岡県田方郡大仁町田京727の
3
⑯ 出願人 東洋醸造株式会社
静岡県田方郡大仁町三福632の
1

明細書

1. 発明の名称

抗生物質ゲンタミシンClaの製造法

2. 特許請求の範囲

(1) グラム陽性桿菌に属する抗生物質ゲンタミシンCla生産菌を培地に培養し、その培養物より抗生物質ゲンタミシンClaを採取することを特徴とする抗生物質ゲンタミシンClaの製造法。

(2) グラム陽性桿菌に属する抗生物質ゲンタミシンCla生産菌が、グラム陽性桿菌ジム・タイランデンセ G 567 である発明請求の範囲1に記載の抗生物質ゲンタミシンClaの製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、抗生物質ゲンタミシンCla (Gentamicin Cla) の新規な製造法に関するものである。

従来より抗生物質ゲンタミシンCla生産菌として、ミクロモノスボラ・ブルブレア (Micromonospora purpurea) (特公昭44-21394号、

米国特許第3,891,572号、Antimicrob. agents and chemother. 1963 7(1), 8, 14, 17および

1,16)、ミクロモノスボラ・エナヌスボラ (Micromonospora ehnicepsora) およびその2変種 (上記同一文献)、ミクロモノスボラ・サガミエンシス (Micromonospora sagamensis) およびその2変種 (特公昭44-42886号)、およびミクロモノスボラ・アルブレア・パリエスター・ブルレセンス (Micromonospora purpurea var. nigrescens) ハンカリー国特許第1,687,778号、J. Antibiot. 30: 945 (1977) が知られていた。

上記の通り、抗生物質ゲンタミシンCla生産菌は、すべてミクロモノスボラ属 (Micromonospora) に属するものであり、その形態的特徴は基生菌系に一例づつ菌子を形成するものであり、さらにミクロモノスボラ属はミクロモノスボラ科 (Micromonosporaceae) に属するものであつた (Bergey's manual of determinative bacteriology 第8版 (1974))。

本発明者らは、静岡県富士市の坂土農業分部

したが菌糸 G 5 6 7 株が抗生素質ゲンタミシン C はを産生するとと見い出し、後述する通り、放散菌 G 3 6 7 株がダクテロスボランジウム属 (

Dactylosporangium) に属するもので、その形態的特徴は基生菌糸に胞子のうを産生し、胞子のう中に鞭毛を有する胞子を形成するもので、さらにこのダクテロスボランジウム属はアクトノアラキス科 (Actinoplanaceae) に属するもので、従来のミクロセノスボラ属とは分類学上、明らかに別の属間での相違が認められるもので、抗生素質ゲンタミシン C はの新属の生産菌であると見い出しました。

また上記の放散菌 G 3 6 7 株の菌学的特徴は次の通りである。

[一] 形態的性状

リング形カルシウム寒天培地 [Bact. Rev. 2.1 : 1 (1957)] 上、30°C、3-7日間培養し、観察した所見は次の通りである。

基生菌糸は細胞状または屈曲状で、分枝をなして伸びし、分離はせず、直径 0.5-0.6 μ であり、

気菌糸は形成しない。

基生菌糸に、大きさ 1.5-2.0 × 2.5 μ の球状または橢円状物体の産生が、寒天培地中に触つた状態でみられる。

基生菌糸より短かい胞子のうを生じ、胞子のうは指形で、寒天培地表面に、1 個または房状に形成する。胞子のうの大きさは、1.0-1.5 × 4.0-6.5 μ で、中で 3-4 倍の胞子がたたいて一列に入っている。

胞子は水中で運動性があり、形は球形、橢円形または桿状形を呈し、大きさは 1.0-3.5 × 1.5-2.5 μ であり、無性で房状の鞭毛を有している。

[二] ジアミノビメリン酸類

全菌体分析によるジアミノビメリン酸は、メソ-二酸およびノゾー型より R- 側の低いもの (slow moving diaminopimelic acid) が検出された。

[三] 各種培地における生育状態等

各種培地上で、30°C、14 日間培養し、観察した所見は次の通りであり、オート・ミール寒天培地上で未発育の気菌糸がわずかに形成される

- 4 -

以外は、気菌糸の形成は認められず、また胞子のうはリング形カルシウム寒天培地上で良好、土器寒天培地 (Japen. Microbiol. 5.0 : 295 (1968)) 上で、中程度であり、その他の培地上ではわずか、またほとんど形成されなかつた。

なお、色の表示は、カラーハーモニー・マニアル (Color Harmony Manual) 第 4 版 1958 年 (Container Corporation of America) による色の分類に従つたものである。

各種培地における生育状態等

培地	生育	基生菌糸の色	可溶性色素
ショタロース・硫酸塩無灰培地 (ワツクスマン培地No.1)※	中程度ないし不良	アブリコット[Apricot(4ic)]ないしダスティ・オレンジ[Dusty Orange(4ic)]	なし
グルコース・コハク・ワゴン染天培地 (ワツクスマン培地No.2)※	不良	ブライト・メロン・イエロー[Brite Melon Yellow(5ia)]ないしアブリコット(4ic)	なし
ダリセリン・アスパラギン無灰培地 (1SP培地5)※※	僅少ないし不良	無色ないしライト・メロン・イエロー[Light Melon Yellow(3ea)]	なし
スター・無硫酸塩無灰培地 (1SP培地4)※※	中程度ないし良好	ルセクト・オレンジ[Russet Orange(4sc)]ないしダスティー・オレンジ(4ic)	なし
チオシン無灰培地 (1SP培地7)※※	僅少ないし不良	アブリコット[Apricot(4gn)]ないしペール・バスクル&オレンジ[pale Pastel Orange(4ic)]	なし
オート・ヒーム無天培地 (1SP培地5)※※	中程度ないし良好	オレンジ・ラスト[Orange Rust(4pe)]ないしルセクト・オレンジ[Russet Orange(4pc)]	なし
イースト・ココス・愛荷エキス無灰培地 (1SP培地2)※※	なし	メイプル[Maple (4ie)]ないしルタジ・タン[Luggage Tan (4ee)]	メイプル(4ie)ないしライト・ブラウン[Light Brown(4ng)]
リンゴ・品カルシウム無天培地	不良	無色	なし
紫雲母無灰培地 (ワツクスマン培地No.14)※	僅少	なし	なし

- 6 -

ベキット寒天培地 (ワツクスマン培地No.30)※	中程度ないし良好	メイプル(4ie)ないしシナモン・タン(4ne)	メイプル(4ie)ないしライト・ブラウン(4ng)
エーワーソン無灰培地 (ワツクスマン培地No.28)※	中程度	バスクル・オレンジ(4ic)ないしメイプル(4ie)	メイプル(4ie)
ハイキー・トレヌー寒天培地 (ワツクスマン培地No.22)※	中程度ないし良好	シナモン[Cinnamon (3ie)]ないしメイプル(4ic)	メイプル(4ie)ないしライト・スペイス・ブラウン[Light Spice Brown(4ig)]
グルコース・イースト・エキス無灰培地 (ワツクスマン培地No.29)※	中程度	メロン・イエロー[Melon Yellow (5ge)]	なし
バゲト・イースト・エキス無灰天培地 (1SP培地6)※※	僅少	無色	なし
土壌寒天培地	僅少ないし不良	なし	なし
ジャガイモ片 (ワツクスマン培地No.40)※	中程度	タイルレッド[Tile Red (5ne)]ないしコッパー[Copper (5ie)]	なし
ジャガイモ片・硫酸カルシウム	なし	なし	なし
ニンジン片	僅少	無色	なし

卷首 *Waksman, S. A.: The Actinomycetes* 1961 P. 327-354 Williams & Wilkins co.

参考 *Inter. J. Syst. Bact.* 16: 513-540 (1966)

参考 *Antimicrob. Agents and Chemother.* 1965 P. 116-124

〔C〕 出理的性状

生理的性状は下記の通りである。

1) 繁殖能の異化性

菌株名	P & G	半 糞	糞
D-アラビノース	土	+	
L-アラビノース	+	+	
D-フクタース	+	+	
D-ガラクトース	+	+	
D-グルコース	+	+	
ダリセロース	...	-	
L-イノシトール	...	-	
D-マンノース	+	+	
D-マンヒトール	+	+	
D-ノリビオース	+	+	
D-ラクトース	+	土	
ズルシトール	...	-	
D-1-レバース	+	+	
D-セロビオース	+	+	
メレジトース	+	+	
ラフィノース	+	-	

- 8 -

特許第55-156592(4)

L-ラムノース	+	+
D-リゴース	-	-
L-ジルガース	-	-
D-ソルビトール	-	-
シユクロース	+	+
D-キシロース	+	+
アドヒトール	-	-
ザリシン	土 ~ +	土 ~ +
スマーテ	+	+
マルトース	+	+
ダキストリン	+	+
イヌリン	-	-

+ : 阳性、- : 阴性、土 : 粪便性、+ : 陰性

※: プリドハム・ゴットリープの無糖培地

※※: Inter. J. Syst. Bact. 21: 240 - 2
47 (1971) によるルエドマンの有機
培地

2) 生育温度範囲: 20 ~ 40°C

3) 脂肪半乳: バブトン化および酸化とともに陽
性

- 9 -

4) メラヘン様色素の生成: 阴性 (ラシンが上
びペプトン・イーストエキス・酵母天培地上)

5) スマーテの加水分解: 阴性

6) セルロースの分解: 阴性

7) カゼインの分解: 阴性

8) チロシンの分解: 阴性

9) セラチンの消化: 阴性

10) 糖化水素の生成: 弱い陽性

11) 脂肪酸の産生: 阴性

12) 生育 PH: PH 5.5 ~ 9.0

上記の通り、本菌 G 5 6 7 株は有糖培地上で、基生
菌株が僅褐色を呈し褐色を呈し、褐色の可溶性色
素を生ずる確微を有することより、ダクチロスピ
ラシジウム・タイランデンセ (*Dactylosporangium*
thailandense) [Arch. Microbiol. 58: 42 -
52 (1967)] に属するものと同定した。

よつて、本菌 G 5 6 7 を、ダクチロスピラシジ
ウム・タイランデンセ G 5 6 7 と名乗らしもので、
また本菌は工業技術院微生物工芸技術研究所に
「申請登録番号第 4840 号」として申請され
ている。

本菌は上記の知見に基いて完成されたもので、
ダクチロスピラシジウム属に属する抗生素質ゲン
タミシン C1a 生産菌を培地上に培養し、その培養物
より抗生素質ゲンタミシン C1a を精製することを
特徴とする抗生素質ゲンタミシン C1a の製造法で
ある。

まず本発明を実施するに当り使用されるダクチ
ロスピラシジウム属に属する抗生素質ゲンタミシ
ン C1a (以下単に「ゲンタミシン C1a」という) の
- 10 -

生産菌としては、上記のダクチロスボランジウム・タイラントンセ G 5 6 7 株がその一例として挙られるもので、また本発明の使用菌はこれに限定されるものでなく、ダクチロスボランジウム属に属するゲンタミシン C 1a 生産菌であればよく、天然または変異性も使用し得る。

次いで、本発明のゲンタミシン C 1a を製造するに当つて併示すれば、上記のダクチロスボランジウム属に属するゲンタミシン C 1a 生産菌を通常の微生物の培養に使用する培地成分を含む培地にて好気的に培養することによつて得られる。培地としては、固形培地または液体培地が用いられるが、特に大量生産のために液体培地、特に水性培地が適当である。

培地の栄養源としては、微生物の培養に通常用いられるものが広く使用される。炭素源としては同化可能な炭素化合物であればよく、例えばグルコース、シタロース、マルトース、スクレーヴ、デキストリゴ、モラクセなどが使用される。窒素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、

— 12 —

例えヨーン、スチアーブ、リカー、大豆粉、絶美粉、小麦グルテン、ペプトン、内エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、アンモニウム塩、硫酸銅などが使用される。その他、リン酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、ナトリウム、コバルト、鉄、マンガンなどの培養が必要に応じて使用される。

培養時間は、菌が発育し、ゲンタミシン C 1a を生産する範囲内で適宜変更し得るが、弊社好ましくは 2.5 ～ 3.5 日である。培養時間は、条件によつて多少異なるが、通常 100 ～ 200 時間程度であつて、ゲンタミシン C 1a が最高活力に達する時間を見計りて適当な時期に培養を終了すればよい。

このようにして得られたゲンタミシン C 1a 生産菌の液体培養の培養物中ににおいて、ゲンタミシン C 1a は液体部分に大部分産生されている。

次いでこのゲンタミシン C 1a 生産菌の培養物からゲンタミシン C 1a を採取するのであるが、ゲンタミシン C 1a は水溶性の塩基性アミノ酸化合物であることを利用して分離精製を行なうことが効果的である。

— 13 —

である。また生産されたゲンタミシン C 1a はバカルス、アズテリス P C 1 2 1 9 を被検菌として、通常の堿基性区分の検査、および定量を行なつたものである。

ゲンタミシン C 1a の分離精製手段の一例を示すなどの通りである。すなわちゲンタミシン C 1a 生産菌を前述の如く培養して得られる培養物から固形分を除いて培養液を得るのであるが、ゲンタミシン C 1a がアミノ酸化合物であるためにその培養物の pH を一概に性質に調整し、これを中和してアルカリ性の液体培養液を得ることが好ましく、次いでこの培養液を陰イオン交換樹脂例えばアシペーライト I R C-50 (NH₄⁺型) のカラムにチャージせしめて吸着せしめ、これにより活性物質を 2N アンモニア水にて溶出せしめ、さらにその溶出液を調節した後、その pH を調整し、陽イオン交換樹脂例えば CM-セッファティクス C-25 (NH₄⁺型) のカラムにチャージせしめて吸着せしめ、0 ～ 0.5 N の濃度勾配をもたせたアンモニア水にて溶出せしめ、その活性区分を

— 14 —

用、これを酸化過酸化し、脱水乾燥することによりゲンタミシン C 1a の粒状白色粉末を過酸化水素の型にて得られる。またこのようにして得られるゲンタミシン C 1a は薄層クロマトグラフィーにて单一スポットを示すものであることが確認になし得る。

次いでこのようにして得られた本発明のゲンタミシン C 1a の物理化学的性状を挙れば次の通りである。

分子量

449 (マススペクトルより)

分子式

C₁₀H₈N₆O₁

比旋光度

[(+)D]₂₅ = +9.6.2 (C = 0.39, H₂O)

ペーパークロマトグラフィー

クロロホルム:メタノール:17%アソセニン (2:1:1) R_f = 0.22

プロパンール:ビリジン:酢酸:水 (6:4:1:5) 上層部 R_f = 0.29

色性状

— 15 —

両第 1 及第 3 行の
「セファゲツクス G」を
「セファゲツクス C」と訂正する。